

# **Trabalho de Conclusão de Curso**

## **A INFLUÊNCIA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA EXPRESSÃO DA CATEPSINA K E SEU PAPEL NOS MECANISMOS DE REABSORÇÃO ÓSSEA EM CISTOS RADICULARES**

**André Goulart Poletto**



**Universidade Federal de Santa Catarina  
Curso de Graduação em Odontologia**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**

André Goulart Poletto

**A INFLUÊNCIA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA  
EXPRESSÃO DA CATEPSINA K E SEU PAPEL NOS  
MECANISMOS DE REABSORÇÃO ÓSSEA EM CISTOS  
RADICULARES**

Trabalho apresentado à Universidade  
Federal de Santa Catarina, como  
requisito para a conclusão de Curso de  
Graduação em Odontologia  
Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Elena Riet  
Correa Rivero  
Co-orientador: Diogo Lenzi Capella

Florianópolis  
2018

André Goulart Poletto

**TÍTULO: A INFLUÊNCIA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO  
NA EXPRESSÃO DA CATEPSINA K E SEU PAPEL NOS  
MECANISMOS DE REABSORÇÃO ÓSSEA EM CISTOS  
RADICULARES**

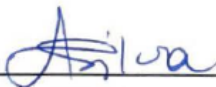
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 05 de Outubro de 2018.

**Banca Examinadora:**



Prof.ª, Dr.ª. Elena Riet Correa Rivero,  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.ª, Dr.ª. Alessandra Dutra da Silva,  
Membro  
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.ª. Me. Rúbia Teodoro Stuepp,  
Membro  
Universidade Federal de Santa Catarina

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
meus maiores exemplos.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, Cesar e Angela, por me incentivarem e me fazerem acreditar que posso sempre ir mais longe, por dedicarem toda a sua vida a seus filhos, nada disso seria possível e faria sentido sem vocês. Ao meu irmão Christiano, meu melhor amigo, um ser humano digno de admiração, com quem aprendi muito nessa jornada. Amo muito vocês.

À minha avó Delícia, o ser humano mais puro e positivo que já tive o prazer de conversar, de quem nunca ouvi nenhuma palavra negativa, e tem o dom de falar as palavras certas nas horas certas, e à minha avó Norma (*In memorian*), que faz uma falta imensa neste mundo, mas que levo comigo todo o amor que você compartilhou com todos nós.

À tia Chris, tio Júnior, Pri, e Henrique, por toda a hospitalidade e por me acolherem nestes anos que passei longe de casa.

À toda a minha família, tios, tias, primos e primas, que me apoiaram, esta conquista também é de vocês.

À minha parceira Heloise, de todas as horas, com quem compartilhei os melhores momentos desses anos, que me compreendeu nos momentos de dificuldade e dividiu comigo as maiores alegrias, a sua presença torna todos os momentos melhores.

À professora e orientadora Elena, pela paciência, confiança e pela leveza que soube conduzir este trabalho, por ser um exemplo de professora e ser humano, não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez por mim,

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal, Daltoé, Filipe e Liliane, por serem um exemplo de organização e me permitirem acompanhá-los na disciplina como monitor. E à professora Alessandra por ter prontamente aceitado o convite para fazer parte da banca avaliadora deste trabalho.

A todos os professores da clínica, em especial aos professores Augusto, Carla Miranda, Gerson, Daltro, Roberto Rocha, Thais Mageste, Sylvio e Nelson por todos os ensinamentos, serem exemplos de profissionais éticos e por toda a segurança que passam aos seus alunos.

Aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, em especial ao Diogo, Buba, Rúbia e Fernanda, com quem tive o prazer de participar dos projetos de pesquisa e me ensinaram muito.

Aos meus companheiros de moradia, Hector, Scopel e Tatá, por serem a minha família durante um tempo, foi um prazer dividir momentos com vocês.

À minha amiga e dupla Tainá, que o destino fez com que nos encontrássemos para dividir as emoções do dia a dia da clínica, que eu sempre soube que pude contar e nunca me decepcionou. Aprendi muito com nossa convivência.

Aos meus companheiros da banda Calafate, Chris, Gijo, Guga, Jorge, Cristhian, e Matheus, com quem tive o prazer de compartilhar a emoção de gravar um álbum e pelas diversas experiências musicais vividas nos últimos anos.

A todos os meus amigos do curso de Odontologia, em especial ao Ângelo, Bruno, Fábio, Felipe, Gabriel Hernandez, Gabriel Magrin Giulia, Hian, João Victor, Leonardo, Maksoel, Victor, Willy e Ana Laura, pelos importantes momentos de descontração, estes anos não teriam sido os mesmos sem vocês.

Aos meus amigos de Lages, por estarem sempre comigo e me apoiarem desde o início da caminhada.

Aos professores das disciplinas básicas por nos proporcionarem o conhecimento necessário para compreendermos melhor tudo o que vinha pela frente.

Aos servidores do departamento de Odontologia, por tornarem nosso dia a dia mais fácil

À Universidade Federal de Santa Catarina, por toda a vivência, diversidade e ensino de qualidade proporcionados.

Aos pacientes, pela paciência, compreensão e confiança, e por tornarem possível o nosso aprendizado.

*“É mais fácil obter o que se deseja com um sorriso do que à ponta da espada”*

*(William Shakespeare)*

## RESUMO

A Catepsina K (CTSK) é uma protease cisteína secretada por osteoclastos, diretamente envolvida no processo de reabsorção óssea. O objetivo deste estudo foi avaliar expressão de CTSK em Cistos Radiculares (CR), verificando a influência do processo inflamatório na sua expressão. Para as reações imunoistoquímicas com o anticorpo anti-CTSK (Santa Cruz) foram utilizados 29 casos de CR. A expressão da CTSK foi avaliada pela média percentual da área positiva em imagens digitalizadas em microscópico de luz com magnitude de 400X, utilizando o software NIH ImageJ 1.45q (National Institutes of Health, Maryland, USA). Para cada caso foram obtidas 5 imagens de áreas inflamadas (inflamação de moderada a intensa) e 5 imagens de áreas livres de inflamação (ou com inflamação mínima). Os resultados foram expressos em mediana. A avaliação estatística dos resultados foi realizada pelo teste Mann-Whitney, sendo considerado  $P \leq 0,05$  para diferenças estatisticamente significantes. Os valores de CTSK foram menores ( $P=0.04$ ) em áreas inflamadas (14) em comparação com as áreas não inflamadas (22). Nossos resultados sugerem que a reabsorção óssea mediada pela CTSK independe da presença de processo inflamatório na cápsula de CR.

**Palavras-chave:** Catepsina K. Cisto Radicular. Processo inflamatório. Reabsorção óssea



## ABSTRACT

Cathepsin K (CTSK) is a cysteine protease expressed by osteoclasts, and is directly involved in the bone resorption mechanism. The aim of this study was to evaluate the expression of CTSK in radicular cysts (RC), and to verify the influence of the inflammatory process in its expression. For immunohistochemistry reaction with antibody anti-CTSK (Santa Cruz), 29 RC cases were selected. The expression of CTSK was evaluated by the average percentage of the positive area using digital images captured by a light microscope in magnification of 400x and utilizing the software ImageJ 1.45q (National Institutes of Health, Maryland, USA). For each case were obtained 5 images of inflamed areas (moderate or severe inflammation) and 5 images of non-inflamed areas (or minimal inflammation). The results were expressed in median. The statistic evaluation was performed by the Mann-Whitney test, considering  $p \leq 0,05$  to statically significant differences. The values of CTSK were lower ( $p=0.04$ ) in inflamed areas (14) comparing to non-inflamed areas (22). Our results suggest that the CTSK mediated bone resorption is independent of the inflammatory process in the RC capsule.

**Keywords:** Cathepsin K. Radicular cyst. Bone resorption. Inflammatory process

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem histológica de Cisto Radicular.....	17
Figura 2 – Imagem radiográfica de Cisto Radicular.....	18
Figura 3 – Imagem ilustrativa da Reabsorção óssea pela Catepsina K.....	21
Figure 1 – Positive cells for CTSK.....	28
Figure 2 – CTSK expression in Inflamed and Non Inflamed areas .....	29

**LISTA DE GRÁFICOS**

Graphic 1 – Cathepsin K expression in inflamed and non-inflamed  
areas.....27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTSK – Catepsina K (*Cathepsin K*)

CR – Cisto radicular

PGE2 – Prostaglandina E2

IL – Interleucina

TNF - Fator de necrose tumoral (*Tumor necrosis factor*)

EGF – Fatores de crescimento epidérmico

RANK – Receptor ativador do fator de kappa nuclear B (*receptor activator of nuclear factor kappa B*)

RANKL – Ligante do receptor ativador do fator de kappa nuclear B (*receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*)

OPG – Osteoprotegerina

RC – Radicular Cyst

mm – Milimeters

H2O2 – Hydrogen Peroxyde

M – Mol

C- Celsius

NIA – Non Inflamed areas

IA – Inflamed areas

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - Por cento

X - vezes

< - menor que

= - igual a

± - mais ou menos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
1.1	CISTOS RADICULARES.....	15
1.2	REABSORÇÃO ÓSSEA E A CATEPSINA K.....	19
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3</b>	<b>ARTIGO .....</b>	<b>23</b>
3.1	INTRODUCTION.....	23
3.2	MATERIAL AND METHODS.....	25
3.2.1	SAMPLE SELECTION.....	25
3.2.2	IMMUNOHISTOCHEMISTRY .....	25
3.2.3	IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS .....	25
3.3	RESULTS.....	27
3.4	DISCUSSION.....	30
3.5	CONCLUSION .....	31
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>
	<b>ANEXO I – Ata de apresentação.....</b>	<b>36</b>
	<b>ANEXO II – Parecer do comitê de ética .....</b>	<b>37</b>

# 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 Cistos Radiculares

Periapicopatias caracterizam-se pela inflamação e destruição dos tecidos perirradiculares, são classificadas como abscesso periapical, granuloma periapical ou cisto radicular (CR), e ocorrem após infecção de origem endodôntica com a saída das bactérias pelo ápice radicular. A prevalência de CR varia de 6% a 55% dentre as lesões periapicais (NAIR et al., 1996). Após a chegada das bactérias ao periápice, os mecanismos imuno-inflamatórios são estimulados, liberando mediadores inflamatórios, citocinas e fatores de crescimento. Estudos mostram que a Prostaglandina E2 (PGE2) (MEGHJI et al., 1996), Interleucina 1 (IL-1) (BARKHORDAR et al., 1992), Interleucina-6 (IL-6) (BARKHORDAR et al., 1999), fator de necrose tumoral (TNF) (DANIN et al., 2000) e fatores de crescimento epidérmico (EGF) (THESLEFF, 1987) podem estimular a proliferação dos restos epiteliais de Malassez, que serve como uma fonte de epitélio que reveste a cavidade cística.

Histologicamente, os CRs são compostos por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso que pode apresentar diferentes graus de infiltrado inflamatório predominantemente crônico, revestido por um epitélio pavimentoso estratificado. A luz destes cistos pode apresentar exsudato inflamatório, colônias de bactérias e fendas de colesterol. As células inflamatórias mais presentes nos CRs são linfócitos, neutrófilos, plasmócitos e macrófagos (NAIR, 2004) (Figura 1). Radiograficamente CRs apresentam-se como uma radiotransparência arredondada bem delimitada e com osteogênese reacional, associada ao ápice radicular de dentes desvitalizados (NEVILLE, 2002) (Figura 2). Os CRs são classificados em duas classes diferentes, o cisto verdadeiro, uma cavidade completamente fechada revestida por epitélio, sem comunicação com o canal radicular, e o cisto *pocket* ou cisto baía, o qual representa uma cavidade revestida por epitélio, mas com comunicação com o canal radicular. (SIMON, 1980)

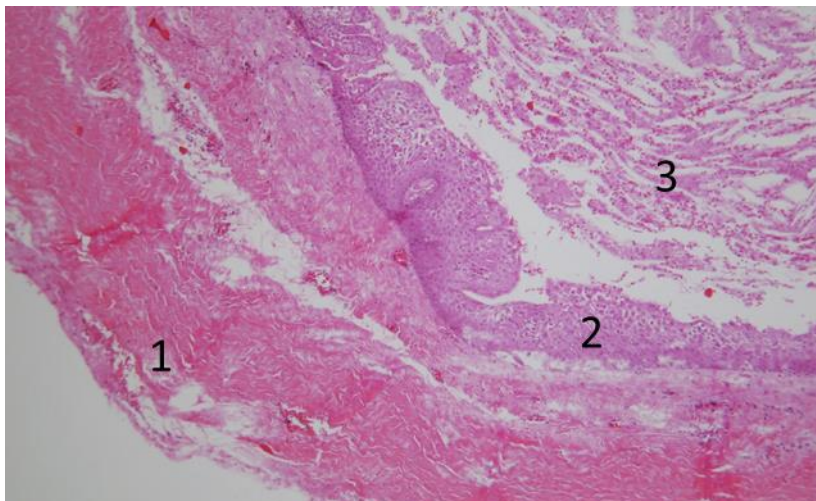
O desenvolvimento dos cistos verdadeiros ocorre em três etapas: na primeira, ocorre a proliferação de tecido epitelial derivado dos restos epiteliais de Malassez, provavelmente pelo estímulo de fatores de crescimento liberados pelas células do processo inflamatório. Na segunda etapa se forma uma cavidade revestida por epitélio. Existem atualmente duas principais teorias para a formação desta cavidade: a primeira é a teoria da deficiência nutricional, que supõe que as células

centrais do tecido epitelial, por estarem longe de sua fonte de nutrição, sofrem processo de necrose e atraem neutrófilos, formando microcavidades que coalescem resultando na cavidade cística, revestida por um epitélio pavimentoso estratificado; a outra teoria é a teoria do abscesso, que postula que o epitélio em proliferação reveste um abscesso formado pela necrose e lise tecidual, devido à natureza das células epiteliais de revestir superfícies de tecido conjuntivo expostas. Na terceira etapa ocorre o crescimento do cisto, cujo mecanismo ainda não está bem estabelecido na literatura. (NAIR, 2004)

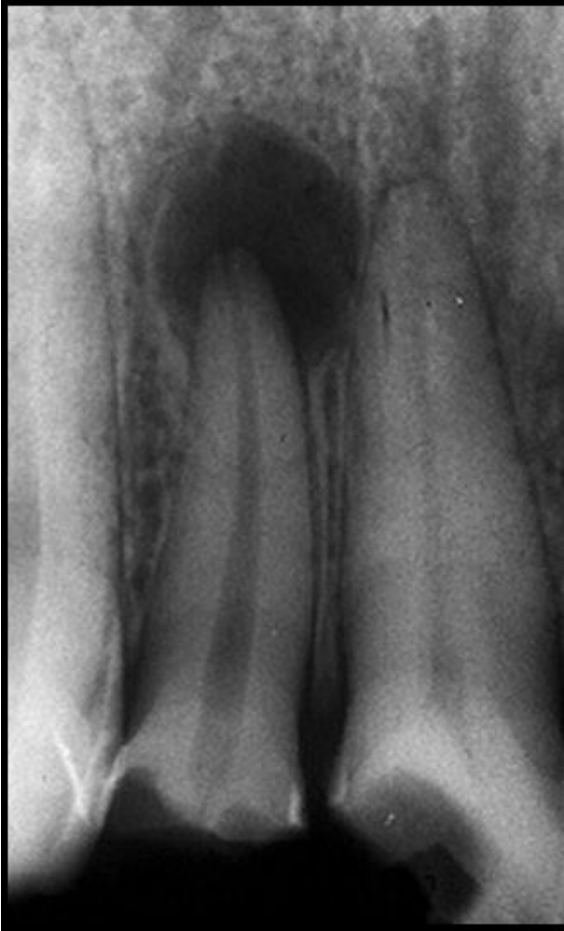
Já o cisto *pocket* provavelmente se desenvolve a partir do acúmulo de neutrófilos em resposta ao acúmulo de bactérias ao redor do forame apical, assim, o epitélio proliferado reveste os micro-abscessos resultantes, formando um cordão epitelial em contato com o ápice radicular.(NAIR, 2004)

O crescimento dos cistos radiculares está também associado a um processo de reabsorção do osso alveolar que circunda o periápice, onde diversas citocinas como IL-1, TNF, IL-6 e IL-11 mediam este processo e também relacionado às moléculas: receptor ativador do fator de kappa nuclear B (RANK), ligante do receptor ativador do fator de kappa nuclear B (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) que têm grande importância na regulação do metabolismo ósseo. (BOYCE; XING, 2008)





**Figura 1** – Imagem histológica de Cisto Radicular: cápsula de tecido conjuntivo fibroso (1) revestido por epitélio pavimentoso estratificado (2), células inflamatórias e fendas de colesterol no lúmen da lesão (3). Coloração Hematoxilina e Eosina, no aumento de 200x.



**Figura 2** – Imagem radiográfica de CR. Lesão radiolúcida unilocular bem delimitada com osteogênese reacional, associada ao ápice do elemento dental.

## 1.2 Reabsorção Óssea e a Catepsina K

O principal mecanismo que regula a reabsorção óssea é o sistema RANK/RANKL/OPG, iniciando-se com a expressão de RANKL pelas células do estroma, que ligam no receptor RANK das células pré-osteoclásticas, possibilitando sua diferenciação em osteoclastos. A expressão de OPG inibe o processo de reabsorção, pois compete com RANKL pelo mesmo receptor RANK, porém quando se liga a este receptor, inibe a diferenciação das células pré-osteoclásticas em osteoclastos. (KHOSLA, 2001). Uma vez diferenciado, o osteoclasto libera proteases responsáveis pela degradação da matriz óssea (SAFTIG et al., 1998). Estas proteases tem um papel importante no metabolismo ósseo e estão envolvidas no desenvolvimento dos cistos radiculares (MENEZES et al., 2008). Dentre as proteases, a Catepsina K (CTSK) é uma das principais envolvidas no processo de reabsorção óssea. (LITTLEWOOD-EVANS et al., 1997) (Figura 3).

A CTSK, da família das cisteínas, participa do processo de reabsorção, degradando principalmente colágeno tipo I (ZHAO et al., 2009). Antigamente acreditava-se que ela era expressa somente por osteoclastos, porém, em estudos mais recentes, foi observado a expressão da mesma em outras células e tecidos, como macrófagos, células dendríticas derivadas da medula óssea, células do coração, pulmão, músculo esquelético, cólon, ovário e placenta (WEN et al., 2016). Saftig et al. (1998), pesquisaram, em modelo animal, osteoclastos deficientes em CTSK, e observaram alterações estruturais nos osteoclastos e uma deficiência no processo de reabsorção óssea.

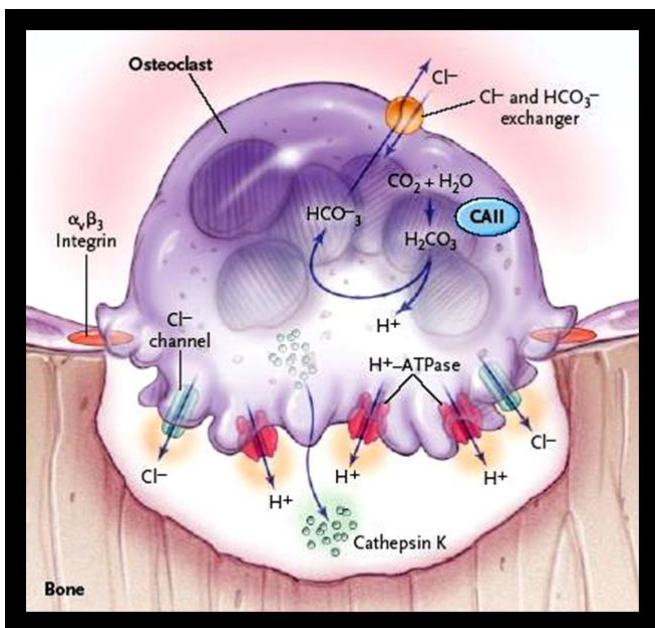
A doença autossômica picnodisostose, relacionada a várias desordens ósseas como osteosclerose, suturas cranianas separadas e ossos frágeis está ligada com uma mutação no gene da CTSK. As características desta mutação em conjunto com o achado da CTSK em células de outros tecidos, sugerem que ela pode constituir outras funções além de degradação das proteínas da matriz óssea (ZHAO et al., 2009).

A expressão de CTSK foi também observada por Beklen et al. (2015), em uma pesquisa de pacientes com doença periodontal. Fibroblastos, macrófagos e células do epitélio gengival apresentaram marcação positiva para CTSK, e um aumento significante da expressão em relação ao grupo controle, reforçando o fato de que a CTSK não é expressa unicamente por osteoclastos. Um aumento na sua expressão também foi observado em lesões como tumores orais e maxilofaciais, periapicopatias, reabsorção fisiológica e patológica da raiz, periimplantite e nos tratamentos ortodônticos, participando do processo de

remodelação óssea, demonstrando a sua presença em células da polpa, do ligamento periodontal, odontoclastos e odontoblastos (WEN et al., 2016). Sua expressão também foi marcante em lesões malignas, como no Melanoma, (QUINTANILLA-DIECK et al., 2008) Carcinoma Basocelular (ISHIDA et al., 2013), Câncer de mama (KLEER et al., 2008) e Carcinoma epidermóide em região de língua (BITU et al., 2013), assim como em linfonodos metastáticos (LEUSINK et al., 2018),

Vários focos terapêuticos relacionados a CTSK vem sendo buscados em pesquisas, o medicamento Odanacatib, um inibidor da expressão da Catepsina K mostrou-se eficiente no tratamento para osteoporose em humanos (DUONG LE et al., 2016) e também demonstrou reduzir a perda óssea e inflamação causadas pela doença periodontal em modelo animal (HAO et al., 2015). Com relação a lesões periapicais, observou-se que a utilização de inibidores específicos de CTSK foi eficiente na redução do tamanho das lesões, da expressão de citocinas pró-inflamatórias, da quantidade de células inflamatórias e da destruição óssea associada a lesão (GAO et al., 2013); (SUZUKI et al., 2015)

Existem poucos estudos sobre o papel da CTSK em cistos radiculares, sendo assim o objetivo deste trabalho foi tentar compreender um pouco mais sobre a sua função, buscando uma relação entre a sua expressão e a intensidade do processo inflamatório presente na cápsula dos CR.



**Figura 3** – Reabsorção óssea pela Catepsina K

Fonte: [www.elportaldelasalud.com/picnodisostosis](http://www.elportaldelasalud.com/picnodisostosis) (2007).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a expressão de CTSK em CRs e relacionar com a intensidade do processo inflamatório presente na cápsula cística.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Verificar a expressão da catepsina K em cistos radiculares.
- Quantificar e relacionar a expressão da catepsina K com a intensidade do processo inflamatório em diferentes áreas das lesões císticas.

### 3 ARTIGO

#### ABSTRACT

Cathepsin K (CTSK) is a cysteine protease expressed by osteoclasts, and is directly involved in the bone resorption mechanism. The aim of this study was to evaluate the expression of CTSK in radicular cysts (RC), and to verify the influence of the inflammatory process in its expression. For immunohistochemistry reaction with antibody anti-CTSK (Santa Cruz), 29 RC cases were selected. The expression of CTSK was evaluated by the average percentage of the positive area using digital images captured by a light microscope in magnification of 400x and utilizing the software ImageJ 1.45q (National Institutes of Health, Maryland, USA). For each case were obtained 5 images of inflamed areas (moderate or severe inflammation) and 5 images of non-inflamed areas (or minimal inflammation). The results were expressed in median. The statistic evaluation was performed by the Mann-Whitney test, considering  $p \leq 0,05$  to statistically significant differences. The values of CTSK were lower ( $p=0.04$ ) in inflamed areas (14) comparing to non-inflamed areas (22). Our results suggest that the CTSK mediated bone resorption is independent of the inflammatory process in the RC capsule.

**Keywords:** Cathepsin K. Radicular cyst. Bone resorption. Inflammatory process

#### 3.1 Introduction

Inflammatory processes in the periapical tissues is usually associated with bacterial infection and necrosis of the dental pulp, which results in an osteolytic lesions of the jaw: the radicular cysts (RC) (NARAYANAN; VAISHNAVI, 2010). Histologically, the RC is composed by a conjunctive tissue capsule, lined by epithelium, which usually derives from the epithelial rests of Malassez, the RC represents 6% to 55% of radiolucent lesions on the periapex (NAIR et al., 1996).

Bone resorption is a common feature in these observed lesions and involve a complex combination of immunologic mechanisms, which may aim primarily to protect the periapical region. However this process also results in the destruction of the periapical tissue.

(STASHENKO et al., 1998). The bone resorption process initiated by the proliferation of immature osteoclast precursors, which express essential molecules that promote the osteoclastogenesis (BOYCE; XING, 2008).

Cathepsin K (CTSK), a member of the cysteine proteases, is considered specifically expressed in osteoclasts and critical for the osteoclast-mediated bone resorption, however this protease was found also expressed in other cells and tissue, involved in extracellular matrix remodeling in organs and tumors (SAFTIG et al., 2000). There is a direct relation between CTSK and the bone resorption process, degrading proteins, especially type I collagen. CTSK is considered as an important therapeutic target for bone loss in many bone diseases and may represent a new target for treatment of periapical diseases(WEN et al., 2016).

Up to date, few studies have investigated the participation of CTSK in RC. For the purpose of contribute to better understanding the stabilization or progression of RC, the objective of this study is to verify the expression of CTSK in RC and the influence of the inflammatory process on its expression.



## **3.2 Material and methods**

### **3.2.1 Sample Selection**

This study was approved by the Ethics Committee in Human Research of the authors' institution (approval number 1055/10). Twenty-nine formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens of periapical cysts cases were selected from the files of oral pathology laboratory at Federal University of Santa Catarina (UFSC). It was considered inclusion criterion, the presence of entire epithelial lining in at least 1/2 of the cystic lesion

### **3.2.2 Immunohistochemistry**

Immunohistochemical reaction was performed using a standard streptavidin-biotin protocol. Sections of 3mm were obtained from routinely processed paraffin-embedded blocks and mounted on 3-aminopropyltriethoxysilane histological slides (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). They were deparaffinized and hydrated sections were immersed in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol to inhibit endogenous peroxidase activity. For antigen retrieval, the sections were boiled in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) for 45 min at 96° C. The sections were incubated overnight with a 1:1000 dilution of a primary antibody against Cathepsin K (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz CA). Slides were rinsed in wash buffer and incubated for 30 minutes with peroxidase-labeled polymer conjugated to goat anti-mouse immunoglobulins (EnVision/HRP, Dako). Diaminobenzidine (Biocare, Concord, CA, USA) was used as a chromogen, and the sections were counterstained with Harris's hematoxylin. A negative control for each case was obtained by omitting the primary antibody. Bone marrow was used as a positive control.

### **3.2.3 Immunohistochemical Analysis**

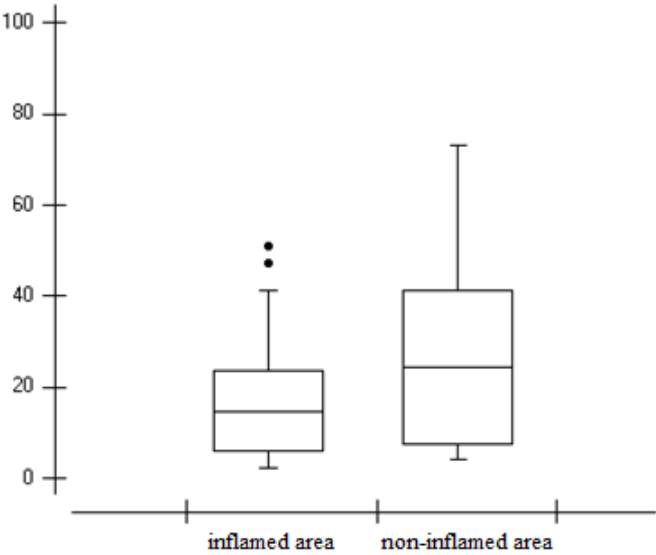
The immunohistochemical analysis was performed using NIH ImageJ 1.45q software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) to examine images captured with a camera (Cannon A620, Beijing, China) attached to a light microscope (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at 400x magnification.

CTSK immunoreactivity was evaluated in the capsule/connective tissue of RC, immediately adjacent to epithelial lining. For each sample, ten fields were selected and separated into: five fields in areas of the capsule with mild inflammation or without the presence of inflammatory cells and the adjacent epithelium of the cyst do not present modifications due to the inflammatory process, characterizing the group “non-inflamed areas (NIA)” and five fields with evident presence of inflammatory cells and the epithelium reactive due to the inflammatory process, characterizing the group “inflamed areas (IA)”. To analyze the expression on cysts capsule, after selecting the groups, the epithelium was removed from the image using the ImageJ tools.

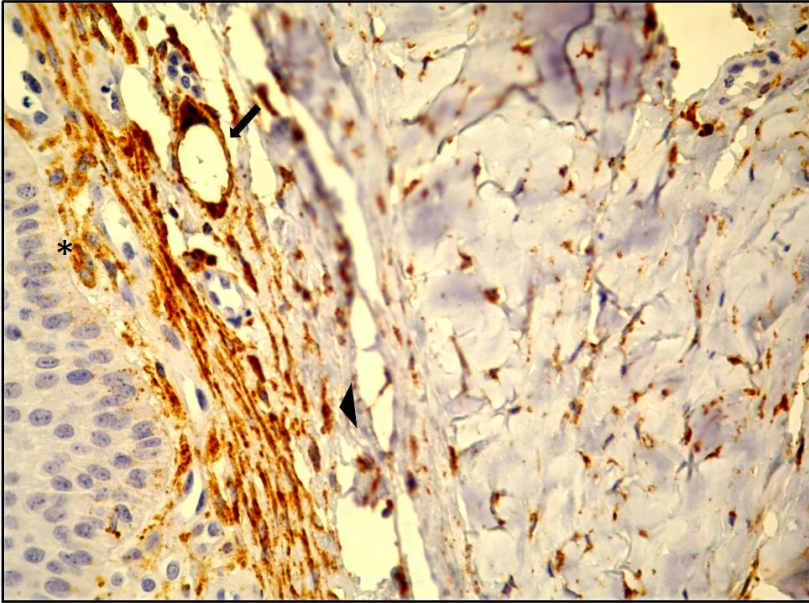
Immunostaining score was defined through the mean percentage of the demarcated area (positive pixels: areas of diaminobenzidine staining) related to the total area in 29 samples of radicular cysts, separated into NIA and IA. Mann-Whitney test was applied to compare the groups and the results were represented as the mean percentages of stained cells/stained area  $\pm$  the mean standard deviation. A P value  $< 0.05$  indicated statistically significant data.

### 3.3 Results

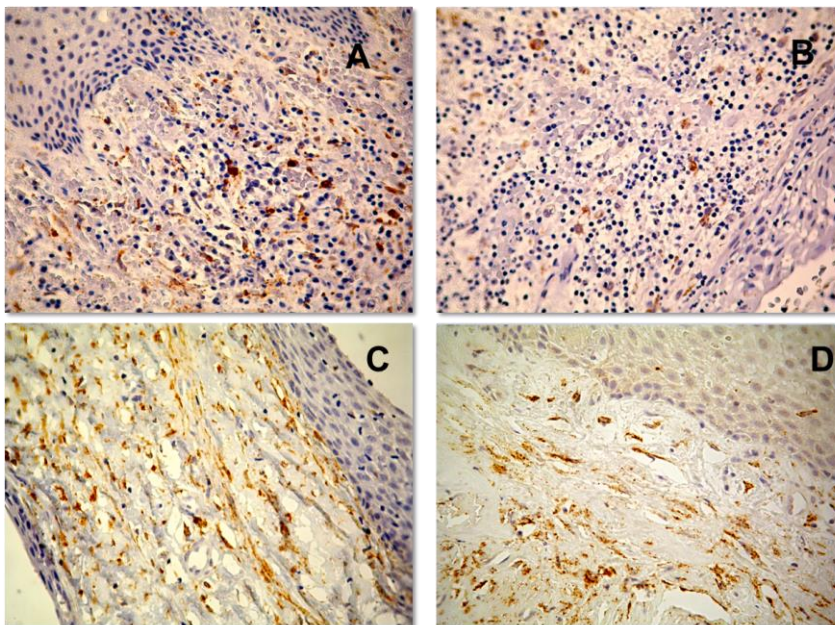
In RC, expression of CTSK-positive cells was present in all the cases and was localized in stromal fibroblast-like cells, macrophage-like cells and vascular endothelial cells (Figure 1). CTSK-positive cells were intense throughout in the fibroblasts in the connective tissue below the epithelial lining, but only a few cells in the inflammatory infiltrate are marked. Epithelial immunoexpression was almost absent. (Figure 2). CTSK expression was higher ( $P=0.04$ ) in NIA (22) comparing to IA (14). (Graphic 1 and Figure 2)



**Graphic 1:** Expression of Cathepsin K in inflamed (14) and non-inflamed área (22) ( $p = 0.04$ )



**Figure 1** – Positive cells for CTSK: Endothelial cells (arrow), Fibroblast (arrowhead) and Macrophage (asterisk).



**Figure 2** – Cathepsin K expression.: **A** and **B** - Inflamed Areas, with several inflammation; **C** and **D** - Non-Inflamed Areas. Optical microscope (Diaminobenzidine 400x).

### 3.4 Discussion

RC has osteolytic activity, and may progress to larger sizes if not treated, so it's important to better understand the resorption mechanism. Since RC has an inflammatory origin, our study is one of the firsts to connect the expression of CTSK to inflammatory infiltrate.

In this study, expression of CTSK was high in the connective tissue bellow de epithelium lining, especially in fibroblasts, macrophages and endothelial vascular cells. These results corroborate with other studies in the literature (PLATT et al., 2007); (BEKLEN et al., 2015), but on the other hand, Santos et al described a higher expression of CTSK in the presence of inflammatory infiltrate. This authors also observed a high expression in the epithelium (more than 76% of positive cells for CTSK in most of the cases) (SANTOS et al., 2017) which differs from our results in which the epithelial immunoexpression was almost absent.

Rong and Armada evaluated the expression of others bone resorption related proteins in periapical affected teeth, and observed a higher expression of RANKL in lesions with intense inflammatory infiltrate, suggesting that inflammation cells are related to the RANKL expression.(FAN et al., 2011); (ARMADA et al., 2015) In our study, CTSK expression was higher in non-inflamed areas of RC, and marked mostly fibroblasts, endothelial cells and macrophages, and only a few inflammatory cells were positive. Because of this, we can suppose that this cells are not directly involved in CTSK expression.

CTSK has been a target for several studies, specially due to its therapeutic potential, Liagn Hao et al. (2015) studied the effect of a CTSK inhibitor in periodontitis mouse model, which resulted in a reduction of bone loss and immune response (HAO et al., 2015). B. Gao et al. (2013) silenced CTSK expression in mouse with periapical lesions and observed a reduction of the periapical lesion size accompanied with a decression of mononuclear leukocyte infiltration and inflammatory cytokines (GAO et al., 2013b). Although, the role of CTSK and its relation with the inflammatory infiltrate is still unclear, more studies are needed to comprehend it.

### **3.5 Conclusion**

Our results suggest that CTSK is involved in the osteolytic activity by the RC growth, and the inflammatory process is not related to the increase of its expression, however more studies are needed to comprehend the relation between the inflammation and CTSK expression.

## REFERÊNCIAS

ARMADA, L. et al. Expression and Distribution of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B, Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand, and Osteoprotegerin in Periradicular Cysts. **J Endod**, v. 41, n. 8, p. 1281-7, Aug 2015. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2015.03.025> >.

BARKHORDAR, R. A.; HAYASHI, C.; HUSSAIN, M. Z. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. **Endod Dent Traumatol**, v. 15, n. 1, p. 26-7, Feb 1999. ISSN 0109-2502 (Print)0109-2502. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BARKHORDAR, R. A.; HUSSAIN, M. Z.; HAYASHI, C. Detection of interleukin-1 beta in human periapical lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 73, n. 3, p. 334-6, Mar 1992. ISSN 0030-4220 (Print)0030-4220. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BEKLEN, A.; AL-SAMADI, A.; KONTTINEN, Y. T. Expression of cathepsin K in periodontitis and in gingival fibroblasts. **Oral Dis**, v. 21, n. 2, p. 163-9, Mar 2015. ISSN 1354-523x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/odi.12230> >.

BITU, C. C. et al. Cathepsin K Is Present in Invasive Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma In Vivo and In Vitro. In: (Ed.). **PLoS One**, v.8, 2013. ISBN 1932-6203 (Electronic).

BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Arch Biochem Biophys**, v. 473, n. 2, p. 139-46, May 15 2008. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.018> >.

DANIN, J. et al. Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 in chronic periapical lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 90, n. 4, p. 514-7, Oct 2000. ISSN 1079-2104 (Print)1079-2104. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1067/moe.2000.108958> >.

DUONG LE, T.; LEUNG, A. T.; LANGDAHL, B. Cathepsin K Inhibition: A New Mechanism for the Treatment of Osteoporosis. **Calcif Tissue Int**, v. 98, n. 4, p. 381-97, Apr 2016. ISSN 0171-967x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00223-015-0051-0> >.

Epithelial cell rests of Malassez bind epidermal growth factor intensely - Thesleff - 1987 - Journal of Periodontal Research - Wiley Online Library. 2018. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0765.1987.tb01609.x> >.



FAN, R. et al. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin expression in chronic apical periodontitis: possible association with inflammatory cells. **Chin Med J (Engl)**, v. 124, n. 14, p. 2162-6, Jul 2011. ISSN 0366-6999 (Print)0366-6999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GAO, B. et al. Inhibiting Periapical Lesions through AAV-RNAi Silencing of Cathepsin K. In: (Ed.). **J Dent Res**, v.92, 2013a. p.180-6. ISBN 0022-0345 (Print)1544-0591 (Electronic).

\_\_\_\_\_. Inhibiting periapical lesions through AAV-RNAi silencing of cathepsin K. **J Dent Res**, v. 92, n. 2, p. 180-6, Feb 2013b. ISSN 1544-0591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23166044> >.

HAO, L. et al. Odanacatib, A Cathepsin K-Specific Inhibitor, Inhibits Inflammation and Bone Loss Caused by Periodontal Diseases. **J Periodontol**, v. 86, n. 8, p. 972-83, Aug 2015. ISSN 0022-3492 (Print)1943-3670 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2015.140643> >.

ISHIDA, M.; KOJIMA, F.; OKABE, H. Cathepsin K expression in basal cell carcinoma. **J Eur Acad Dermatol Venerol**, v. 27, n. 1, p. e128-30, Jan 2013. ISSN 0926-9959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-3083.2011.04436.x> >.

KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5050-5, Dec 2001. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/endo.142.12.8536> >.

KLEER, C. G. et al. Epithelial and stromal cathepsin K and CXCL14 expression in breast tumor progression. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 17, p. 5357-67, Sep 1 2008. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-0732> >.

LEUSINK, F. K. et al. Cathepsin K associates with lymph node metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 385, Apr 5 2018. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-018-4315-8> >.

LITTLEWOOD-EVANS, A. et al. Localization of cathepsin K in human osteoclasts by in situ hybridization and immunohistochemistry. **Bone**, v. 20, n. 2, p. 81-6, Feb 1997. ISSN 8756-3282 (Print)1873-2763. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MEGHJI, S. et al. The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. **Arch Oral Biol**, v. 41, n. 6, p. 523-31, Jun 1996. ISSN 0003-9969 (Print)0003-9969. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MENEZES, R. et al. Differential patterns of RANKL/OPG expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the

lesions. **J Endod**, v. 34, n. 8, p. 932-8, Aug 2008. ISSN 0099-2399 (Print)1878-3554 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2008.05.002> >.

NAIR, P. N. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 15, n. 6, p. 348-81, Nov 1 2004. ISSN 1045-4411. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NARAYANAN, L. L.; VAISHNAVI, C. Endodontic microbiology. **J Conserv Dent**, v. 13, n. 4, p. 233-9, Oct 2010. ISSN 0972-0707. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4103/0972-0707.73386> >.

NEVILLE, B. W. **Oral & maxillofacial pathology**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2002. ISBN 0721690033  
CIP entry.

PLATT, M. O. et al. Expression of cathepsin K is regulated by shear stress in cultured endothelial cells and is increased in endothelium in human atherosclerosis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n. 3, p. H1479-86, Mar 2007. ISSN 0363-6135 (Print)0363-6135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00954.2006> >.

QUINTANILLA-DIECK, M. J. et al. Cathepsin K in melanoma invasion. **J Invest Dermatol**, v. 128, n. 9, p. 2281-8, Sep 2008. ISSN 0022-202x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2008.63> >.

RAMACHANDRAN NAIR, P. N.; PAJAROLA, G.; SCHROEDER, H. E. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 81, n. 1, p. 93-102, Jan 1996. ISSN 1079-2104 (Print)1079-2104. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SAFTIG, P. et al. Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice. **Adv Exp Med Biol**, v. 477, p. 293-303, 2000. ISSN 0065-2598 (Print)0065-2598. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1007/0-306-46826-3\\_32](http://dx.doi.org/10.1007/0-306-46826-3_32) >.

\_\_\_\_\_. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 23, p. 13453-8, Nov 10 1998. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SANTOS, S. C. L. T. et al. Participation of osteoclastogenic factors in immunopathogenesis of human chronic periapical lesions. **J Oral Pathol Med**, v. 46, n. 9, p. 846-852, Oct 2017. ISSN 1600-0714. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28731540> >.

SIMON, J. H. Incidence of periapical cysts in relation to the root canal. **J Endod**, v. 6, n. 11, p. 845-8, Nov 1980. ISSN 0099-2399 (Print)0099-2399. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0099-2399\(80\)80039-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0099-2399(80)80039-2) >.

STASHENKO, P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 9, n. 4, p. 498-521, 1998. ISSN 1045-4411 (Print)1045-4411. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SUZUKI, N.; TAKIMOTO, K.; KAWASHIMA, N. Cathepsin K Inhibitor Regulates Inflammation and Bone Destruction in Experimentally Induced Rat Periapical Lesions. **J Endod**, v. 41, n. 9, p. 1474-9, Sep 2015. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25990199> >.

WEN, X. et al. The role of cathepsin K in oral and maxillofacial disorders. **Oral Dis**, v. 22, n. 2, p. 109-15, Mar 2016. ISSN 1601-0825. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26458004> >.

ZHAO, Q.; JIA, Y.; XIAO, Y. Cathepsin K: a therapeutic target for bone diseases. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 380, n. 4, p. 721-3, Mar 2009. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19338743> >.

## ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE ODONTOLOGIA  
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA

**ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Aos cinco dias do mês de outubro de dois mil e dezoito, às oito horas, em sessão pública no Auditório do Centro de Ciências da Saúde desta Universidade, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Elena Riet Correa Rivero e pelas examinadoras Rúbia Teodoro Stuepp e Alessandra Dutra da Silva, o aluno André Goulart Poletto apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado "A influência do processo inflamatório na expressão da Catepsina K e seu papel nos mecanismos de reabsorção óssea em Cistos Radiculares" como requisito curricular indispensável à aprovação na Disciplina de Defesa do TCC e a integralização do Curso de Graduação em Odontologia. A Banca Examinadora, após reunião em sessão reservada, deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido Trabalho de Conclusão do Curso, divulgando o resultado formalmente ao aluno e aos demais presentes, e eu, na qualidade de presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo aluno orientando.

Professora Doutora Elena Riet Correa Rivero

Professora Mestre Rúbia Teodoro Stuepp

Professora Doutora Alessandra Dutra da Silva

André Goulart Poletto

## ANEXO II

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação biológica de tumores odontogênicos benignos com crescimento infiltrativo

**Pesquisador:** Elena Riet Correa Rivero

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 49115915.5.0000.0121

**Instituição Proponente:** Departamento de Patologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.265.803

**Apresentação do Projeto:**

A pesquisa intitulada "Avaliação biológica de tumores odontogênicos benignos com crescimento infiltrativo" é do tipo observacional descritiva, retrospectiva contando a pesquisadora com a participação de 70 participantes de pesquisa que autorizarão o uso de material já coletado em procedimento anterior e alheio a presente pesquisa armazenado no Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (LPB); também se fará consulta as fichas de biópsias.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Contribuir para um melhor entendimento do comportamento biológico das lesões odontogênicas, especialmente o AM e o TOC, por meio do estudo das interações parênquima/estroma nos mecanismos de crescimento e invasão tumoral.

**Objetivo Secundário:**

- Estabelecer a incidência de TOCs e AMs diagnosticados no LPB/UFSC nos anos de 2006 até 2014;
- Determinar o perfil clínico dessas lesões, verificando dados em relação ao paciente como: sexo, idade, etnia, e dados em relação à lesão como: localização, tamanho, presença de recidiva, entre outras características;
- Verificar a associação entre o TOC e a presença da Síndrome do Carcinoma Nevóide de Células

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400  
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
Telefone: (48)3721-6004 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.285.833

**Basais;**

- Fazer a classificação histológica dos casos de AM de acordo com a classificação da OMS (Organização Mundial de Saúde) de 2005;
- Fazer a avaliação histológica dos casos de TOC, visando observar as características descritas na classificação da OMS de 2005;
- Avaliar a frequência de expressão de proteínas relacionadas com o crescimento e invasão tumoral, como as MMPs -7 e -25; podoplanina; caveolina -1, RANK, RANKL; OPG; cathepsina K; IL-6, MF e Ki-67, em AM e TOCs, e comparar essa expressão com cistos radiculares/residuais.
- Comparar a expressão dessas proteínas em AM e TOCs, com cistos radiculares/residuais, os quais representam lesões de origem odontogênica não neoplásicas.
- Correlacionar os achados deste estudo com os já existentes na literatura.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Uma vez que será utilizado material de arquivo, o único risco desta pesquisa seria a perda do anonimato, porém, é compromisso veemente dos pesquisadores envolvidos manter o sigilo sobre a identidade dos participantes.

**Benefícios:**

Em um levantamento realizado por nosso grupo de pesquisa, envolvendo dois Serviços de diagnóstico ligados ao SUS no Estado de SC, o tumor odontogênico ceratocístico (TOC) e o ameloblastoma (AM) foram os tumores odontogênicos (TO) mais frequentes, acometendo, na maioria das vezes, pacientes jovens. Embora a maioria dos TO seja benigna, sendo os tumores malignos raros, alguns desses tumores, como o AM, mixoma e TOC, apresentam um comportamento agressivo, quando comparados aos demais tumores benignos ou aos cistos de origem odontogênica. O tratamento do AM e mixoma consiste, na maioria dos casos, em remoção cirúrgica em bloco, ou seja, com margem de segurança de 1 a 3cm, o que acaba acarretando em alta morbidade para os pacientes, os quais muitas vezes, ainda estão em fase de crescimento ósseo. Essa modalidade terapêutica também é aplicada em alguns casos de TOC. As interações parênquima/estroma no mecanismo de invasão dessas lesões ainda são pouco abordadas na literatura da área. Como resultado, ainda existem lacunas importantes na compreensão do comportamento biológico dessas neoplasias, especialmente no que diz respeito aos mecanismos de invasão e osteoclastogênese. O conhecimento detalhado dos mecanismos de invasão dessas lesões poderá possibilitar o estabelecimento de alternativas terapêuticas menos invasivas.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Rectoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400  
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
 Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC**



Continuação do Parecer: 1.285.933

melhorando dessa forma a vida dos pacientes que apresentam essas lesões.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa apresenta fundamentação bibliográfica, clareza em seus objetivos, pertinência e uma vez obtido os dados conclusivos, possibilitará a pesquisadora alternativas terapêuticas menos invasivas melhorando a resposta ao tratamento dessas lesões.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os documentos estão de acordo com as solicitações do CEP/SH.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Foram constatadas alterações pontuais no TCLE, não havendo inadequações, ou impedimentos a realização da pesquisa.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PS_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_585386.pdf	29/09/2015 11:10:31		Acelto
Outros	RESPOSTACEPSH.pdf	29/09/2015 11:08:42	Elena Riet Correa Rivero	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.pdf	29/09/2015 11:06:59	Elena Riet Correa Rivero	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoDaInstituicao.pdf	10/09/2015 17:20:12	Elena Riet Correa Rivero	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDePesquisaDetalhado.pdf	04/09/2015 10:42:39	Elena Riet Correa Rivero	Acelto
Folha de Rosto	folhaDeRostoAssinada.pdf	04/09/2015 10:42:12	Elena Riet Correa Rivero	Acelto

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400  
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS  
 Telefone: (48)3721-8094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.285.823

Não

FLORIANOPOLIS, 19 de Outubro de 2015

---

Assinado por:  
Washington Portela de Souza  
(Coordenador)